

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker dan Hepatitis merupakan masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan angka kematian tinggi di seluruh dunia. Pada tahun 2012, sekitar 8,2 juta kematian disebabkan oleh penyakit tersebut (KemkesRI, 2015). Pada kasus penyakit kanker saat ini mengalami peningkatan dari 12,7 juta kasus pada tahun 2008 menjadi 14,1 juta kasus pada tahun 2012. Sedangkan jumlah kematian meningkat dari 7,6 juta orang pada tahun 2008 menjadi 8,2 juta pada tahun 2012. Menurut data *GLOBOCAN (IARC)* tahun 2012 juga diketahui bahwa kanker payudara merupakan penyakit kanker dengan persentase sebesar 43,9% dan persentase kematian yang diakibatkan kanker payudara sebesar 12,9% (KemkesRI, 2015). Masalah selanjutnya ialah mengenai Hepatitis dimana menurut hasil riskesdas tahun 2013 bahwa jumlah orang yang didiagnosis Hepatitis di fasilitas kesehatan berdasarkan gejala-gejala yang ada, menunjukkan peningkatan 2 kali lipat apabila dibandingkan data tahun 2007 dan 2013, hal ini dapat memberikan petunjuk awal kepada kita tentang upaya pengendalian dimasa lalu, peningkatan akses, potensial masalah dimasa yang akan datang apabila tidak segera dilakukan upaya-upaya yang serius (Kemkes RI, 2014).

Pada saat ini jika penyakit kanker dan hepatitis tersebut dapat dideteksi atau ditangani sejak dini maka kemungkinan sembuh akan lebih tinggi, maka dari itu saat ini banyak dikembangkan cara pengobatan yang efektif dalam mengatasi masalah Kanker ataupun Hepatitis. Salah satu caranya ialah menggunakan suatu protein rekombinan. Protein rekombinan yang digunakan ialah *Human Interferon Alfa-2a* (hIFN- α 2a). Protein tersebut merupakan suatu protein terapeutik yang saat ini dikenal dengan protein *Human Interferon Alfa-2a* (hIFN- α 2a). Protein hIFN- α 2a sudah dikenal sebagai sitokinin yang digunakan untuk pengobatan Hepatitis

dan Kanker. *Human Interferon Alfa-2a* (hIFN- α 2a) adalah sebuah glikoprotein yang terdiri dari 16 asam

amino dengan ukuran bobot molekul 19 kDa. Interferon sendiri merupakan protein yang disekresikan akibat dari paparan virus, bakteri dan makromolekul yang lain oleh sel-sel Eukaryotik (Ningrum, 2014; Ningrum *et al.*, 2016). Saat ini rhIFN- α 2a telah banyak digunakan untuk terapi beberapa tipe kanker seperti *hairy cell leukemia*, *non-hodgkin lymphoma*, *renal cell carcinoma*, *chronic myelogenous leukemia* dan *T-cell lymphoma*, serta penyakit hepatitis B dan hepatitis C (Ningrum, 2016).

Pada dasarnya protein Interferon (IFN) dapat diproduksi oleh tubuh manusia secara alami, tetapi dalam tubuh manusia jumlah protein Interferon tersebut masih sedikit, sedangkan agen pembawa penyakit memiliki jumlah yang jauh lebih banyak, sehingga mengakibatkan kurang optimalnya protein IFN dalam melawan agen penyakit tersebut. Pada kondisi tersebut manusia memerlukan penambahan IFN dari luar tubuh. Kebutuhan IFN dari luar tubuh dapat dipenuhi melalui produksi protein rekombinan IFN (Gow & Mutimer, 2001; Dingermann, 2008). Produksi protein rekombinan IFN terus dilakukan, salah satunya adalah protein rekombinan IFN α -2a manusia (rhIFN α -2a). Protein tersebut telah direkomendasikan oleh *United States Food and Drug Administration* (US FDA) pada tahun 1986 sebagai protein terapeutik untuk penanganan hepatitis dan beberapa kanker seperti *multiple myeloma*, *chronic myeloid leukemia*, *renal cell carcinoma*, *epidermoid cervical cancer*, *melanoma* dan *medullary thyroid carcinoma* (Tagliaferri *et al.*, 2005).

Sebagai protein terapeutik, IFN memiliki kekurangan, yaitu bobot molekul kecil sehingga waktu paro eliminasi singkat. Hal tersebut mendorong dilakukan metode modifikasi protein. Salah satu modifikasi protein yang dilakukan ialah dengan cara meningkatkan bobot molekul. Proses meningkatkan bobot molekul tersebut dengan melalui teknologi fusi dengan menggunakan protein lain seperti protein *Human Serum Albumin* (HSA). *Human Serum Albumin* merupakan protein utama dalam plasma darah yang diproduksi oleh hati dan berperan dalam menjaga osmolaritas darah dan membawa molekul-molekul kecil. HSA dipilih karena

memiliki waktu paruh ($t^{1/2}$) yang panjang dalam tubuh yaitu kurang lebih 9 hari, terdistribusi luas dalam tubuh. Keunggulan lainnya adalah, HSA dapat meningkatkan kelarutan dan stabilitas protein. Protein rhIFN- α 2a yang difusikan dengan HSA diharapkan dapat mengurangi frekuensi terapi menjadi lebih singkat yaitu hanya sekali dalam dua minggu (Ningrum, 2016).

Dalam melakukan pengekspresian protein rekombinan tersebut memerlukan suatu inang mikroba. Mikroba diperlukan sebagai inang dalam Teknologi DNA Rekombinan. Rekombinasi DNA adalah pembentukan kombinasi baru dari materi pembawa informasi genetik. Rekombinasi dilakukan dengan melakukan penyisipan molekul asam nukleat yang dikerjakan di luar sel ke suatu vektor dan dibawa masuk ke dalam sel inang. Rekombinasi DNA memerlukan adanya vektor dan enzim. Adapun teknologi DNA rekombinan adalah kumpulan teknik atau metode yang digunakan untuk mengkombinasikan gen-gen di dalam tabung reaksi, yang telah memungkinkan untuk mengisolasi DNA dari berbagai organisme, menggabungkan DNA yang berasal dari organisme berbeda sehingga terbentuk DNA rekombinan, memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel organisme prokariot maupun eukariot hingga DNA rekombinan dapat bereplikasi dan bahkan dapat diekspresikan. Teknologi DNA rekombinan mempunyai dua manfaat yang pertama ialah dengan mengisolasi dan mempelajari masing-masing gen akan diperoleh pengetahuan tentang fungsi dan mekanisme kontrolnya, dan yang kedua dimana teknologi ini memungkinkan diperolehnya produk gen tertentu dalam waktu lebih cepat dan jumlah yang lebih besar daripada produksi secara konvensional (Lilis, 2009).

Pada saat ini salah satu mikroba yang dapat digunakan sebagai pengekspresi suatu protein ialah *Yeast Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) adalah ragi metilotropik yang secara teknik genetik digunakan sebagai sel inang untuk produksi protein rekombinan, dan ragi ini cocok untuk mengekspresikan protein asing, karena ada dua alasan, yang pertama dapat dengan mudah di manipulasi pada level genetik molekuler, dan ragi ini dapat melakukan banyak modifikasi protein eukariotik yang lebih tinggi seperti Glikosilasi (Cregg *et al.*, 2000). *P. pastoris* dapat tumbuh di medium sederhana dan tumbuh dengan densitas sel yang sangat tinggi. Eksistensi dari Alkohol Oksidasi-1 (AOX1) yang di induksi sebagai sebuah

promotor yang sangat kuat yang membuat ekspresi dari protein rekombinan dikontrol dengan mudah dengan cara di induksi (Skoko *et al.*, 2003).

Human Interferon Alfa-2a telah diaplikasikan secara luas sebagai obat, tetapi penggunaan protein tersebut masih memiliki keterbatasan. Kekurangan rhIFN α 2a adalah molekulnya mudah dikeluarkan dari dalam tubuh. Karakteristik hIFN α 2a yang memiliki bobot molekul kecil yaitu 19 kDa dan titik isoelektrik 6 menyebabkan rhIFN α 2a memiliki jalur eliminasi utama dari dalam tubuh melalui sistem bersihan ginjal oleh filtrasi glomerulus. Filtrasi glomerulus ginjal bersifat selektif terhadap ukuran dan muatan. Filter glomerulus terdiri atas tiga lapisan, yaitu lapisan endotel, membran basal, dan slit diafragma. Membran basal glomerulus terdiri atas protein berukuran besar seperti laminin, kolagen tipe IV, entaktin dan proteoglikan sulfat. Proteoglikan sulfat yang mengikat rantai heparin dan kondroitin sulfat memiliki muatan negatif serta berkontribusi dalam selektifitas muatan. Slit diafragma memiliki ukuran pori 4 x 14 nm yang berperan pada selektifitas ukuran. Protein yang memiliki bobot molekul kecil, yaitu lebih kecil dari 30 KDa dan bermuatan total positif akan tereliminasi dengan cepat dari dalam tubuh (Ningrum, 2015)

Eliminasi dalam tubuh yang cepat menyebabkan waktu paro eliminasi menjadi singkat. Waktu paro eliminasi adalah waktu yang diperlukan tubuh untuk menghilangkan konsentrasi obat yang masuk menjadi tinggal setengahnya dari konsentrasi semula. Waktu paro elimiasi sangat menentukan frekuensi pemberian obat. Waktu paro hIFN α 2a yang tersedia di perdagangan (Roferon®, Roche) dan diberikan secara injeksi melalui intravena adalah 5 jam. Konsekuensi dari waktu paro yang pendek adalah waktu paro eliminasi dan waktu tinggal rata-rata dalam tubuh (mean residence time atau MRT) menjadi singkat sehingga frekuensi terapi harus ditingkatkan. Konsentrasi efektif hIFN α 2a diperoleh melalui frekuensi pemberian tiga kali per minggu, yaitu selama 24 sampai 48 minggu untuk pengobatan hepatitis dan setiap hari selama tiga sampai 10 minggu untuk pengobatan kanker. Frekuensi pemberian tinggi dapat menimbulkan fenomena relapse pada penanganan infeksi virus, meningkatkan biaya terapi dan menimbulkan ketidaknyamanan pada penderita. Strategi peningkatan waktu paro

eliminasi hIFN α 2a telah dilakukan dengan berbagai macam pendekatan modifikasi protein untuk meningkatkan kualitas hidup penderita. (Ningrum, 2015)

Uji stabilitas ekspresi dilakukan untuk mengetahui kestabilan ekspresi protein pada setiap generasi yang di ekspresikan oleh protein rhIFN α -2a. Kondisi generasi tersebut dapat memberikan informasi mengenai stabilitas untuk hasil dari biofarmasetika (Diress *et al.*, 2010). Protein rhIFN α -2a dapat dievaluasi berdasarkan profil protein. Analisis profil protein pada penelitian ini berbasis SDS-PAGE non-reducing. Kondisi non reducing dinilai lebih presentatif dalam menunjukkan laju agregasi dan degradasi suatu protein. Ruiz *et al* (2006) juga menyebutkan bahwa penentuan laju agregasi protein rhIFN α -2a dibawah kondisi reducing lebih rendah dibandingkan dengan kondisi non-reducing. Pada penelitian sebelumnya, telah mencapai ekspresi tingkat tinggi dari IFN α -2a manusia dalam ragi *P. pastoris* rekombinan (Ningrum *et al.*, 2015), namun belum diketahui tingkat kestabilan pada setiap generasi nya. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kestabilan dari kerangka baca terbuka protein Interferon Alfa-2a baik yang difusikan oleh HSA atau pun yang tidak di fusikan, penelitian ini juga sangat penting untuk penelitian lanjutan khususnya pada produksi protein terapeutik fusi dan non fusi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah disampaikan, maka dibuat rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

Bagaimanakah stabilitas ekspresi kerangka baca terbuka Penyandi Protein Human Interferon Alfa-2a fusi dan non fusi pada *yeast P. pastoris*?

1.3. Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut untuk menentukan stabilitas tersebut makadapat diuraikan beberapa pertanyaan penelitian, yaitu:

- a. Bagaimana cara mengetahui waktu generasi *P. pastoris*?
- b. Bagaimanakah stabilitas dari hasil Produksi protein Interferon sampai 48 generasi *P. pastoris*?
- c. Bagaimana hasil Karakterisasi protein fusi dan non fusi dot-Blotting generasi *P. pastoris* sampai 48 generasi?

1.4. Batasan Masalah

Batasan pada penelitian ini adalah kestabilan kerangka baca terbuka dari protein Interferon α -2a Fusi dan Non Fusi yang diekspresikan pada *Yeast P. pastoris* sampai dengan 48 generasi serta skrining menggunakan dot-Blotting dan karakterisasi menggunakan *Western Blotting*.

1.5. Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini untuk menguji kestabilan protein Interferon Alfa-2a fusi dan non fusi berdasarkan waktu generasi sari sel inang yeast *P. pastoris*

1.6. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi mengenai stabilitas rhIFN α -2a yang diproduksi pada *Yeast P. pastoris*. Data mengenai stabilitas protein sangat diperlukan untuk produksi skala besar yang tepat agar aktivitas dan keefektifan protein terapeutik dapat mencapai kondisi yang optimal.

1.7. Asumsi

Asumsi dari penelitian ini ialah :

- a. Saat ini rhIFN- α 2a telah banyak digunakan untuk terapi beberapa tipe kanker seperti hairy cell leukemia, non-hodgkin lymphoma, renal cell carcinoma, chronic myelogenous leukemia dan T-cell lymphoma, serta penyakit hepatitis B dan hepatitis C (Ningrum, 2016).
- b. Protein rhIFN- α 2a yang difusi dengan HSA diharapkan dapat mengurangi frekuensi terapi menjadi hanya sekali dalam dua minggu (Ningrum, 2016).

1.8. Hipotesis

Protein Interferon Alfa-2a Fusi dan Non-Fusi selama masa pengekspresian 72 jam diperkirakan stabil selama 48 generasi,

1.9. Struktur Organisasi

Pada struktur organisasi penulisan skripsi ini akan dijabarkan mengenai kerangka skripsi secara umum, hal-hal yang menggambarkan setiap bab serta keterkaitan antar bab nya. Adapun struktur organisasi ini mengacu pada pedoman karya tulis ilmiah Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) tahun 2016. Struktur organisasi yang digunakan terdiri dari lima bagian, yaitu pendahuluan, kajian

pustaka atau dasar teori, metode penelitian, temuan/hasil dan pembahasan serta kesimpulan dan saran.

Bab I : Pendahuluan merupakan bagian yang menggambarkan alasan dan hal-hal yang mendasari penelitian. Bab ini terdiri dari latar belakang, rumusan masalah, pertanyaan penelitian, tujuan penelitian, manfaat penelitian, dan struktur organisasi skripsi.

Bab II: Dasar teori menjabarkan sumber-sumber yang didapatkan dalam melakukan penelitian dan penulisan. Bab ini berisi tentang teori-teori dan deskripsi yang relevan terkait tema penelitian. Bagian dasar teori secara umum menggambarkan teori dan deskripsi mengenai Protein Interferon, Interferon Beta, Interferon Alfa, Kerangka Baca Terbuka, Stabilitas Ekspresi Kerangka Baca Terbuka, Protein Terapeutik, Produksi Protein Rekombinan pada *P. pastoris*.

Bab III : Metode penelitian menggambarkan alur dan tata cara pengambilan serta pengolahan data. Secara umum, bagian ini memberikan informasi tentang cara yang dilakukan peneliti dalam memperoleh dan menganalisis data menjadi informasi yang dituangkan dalam skripsi. Bagian metode penelitian terdiri dari lokasi, waktu pelaksanaan, jenis penelitian, alat dan bahan, analisis data, prosedur penelitian, dan alur penelitian.

Bab IV : Temuan/hasil dan pembahasan memaparkan isi dari hasil penelitian secara keseluruhan. Pada bab ini dipaparkan terlebih dahulu temuan penelitian kemudian hasil temuan penelitian tersebut dikembangkan dan dibahas berdasarkan teori dan sumber referensi yang ada dalam dasar teori

Bab V : Kesimpulan dan saran berisikan simpulan atau inti dari penelitian yang telah dilakukan. Pada bab ini juga berisikan saran yang diajukan peneliti untuk penelitian selanjutnya yang sejenis.